

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

09913770

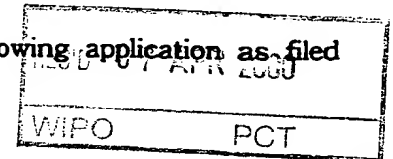
PCT/JP00/00927

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

18.02.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.



出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 5月 6日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第125768号

出 願 人

Applicant (s):

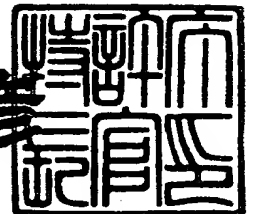
武田薬品工業株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 3月24日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3019088

【書類名】 特許願

【整理番号】 A99078

【提出日】 平成11年 5月 6日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/10

【発明の名称】 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

【請求項の数】 25

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市春日 1 丁目 7 番地 9 武田春日ハイツ 4
0 4 号

【氏名】 渡辺 卓也

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市並木 4 丁目 1 0 番地 1 9 0 9 号棟 - 3
0 3 号室

【氏名】 寺尾 寧子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市春日 1 丁目 7 番地 9 武田春日ハイツ 7
0 3 号

【氏名】 新谷 靖

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100073955

【弁理士】

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100110456

【弁理士】

【氏名又は名称】 内山 務

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第 41336号

【出願日】 平成11年 2月19日

【整理番号】 A99025

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000053

【包括委任状番号】 9721047

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質およびその DNA

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。

【請求項 2】 請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項 3】 請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

【請求項 4】 DNA である請求項 3 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】 配列番号：2 で表される塩基配列を有する請求項 3 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】 請求項 3 記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項 7】 請求項 6 記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。

【請求項 8】 請求項 7 記載の形質転換体を培養し、請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法。

【請求項 9】 請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、請求項 2 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体。

【請求項 10】 請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である請求項 9 記載の抗体。

【請求項 11】 請求項 9 記載の抗体を含有してなる診断薬。

【請求項 12】 請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、請求項 2 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることにより得られる請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド。

【請求項 13】 請求項 12 記載の G 蛋白質共役型レセプターのリガンドを含有してなる医薬。

【請求項 14】請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、請求項 2 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。

【請求項 15】請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、請求項 2 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とするリガンドと請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 16】請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、請求項 2 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とするリガンドと請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 17】請求項 15 記載のスクリーニング方法または請求項 16 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

【請求項 18】請求項 15 記載のスクリーニング方法または請求項 16 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 19】請求項 3 記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

【請求項 20】請求項 3 記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列およびその一部を含有してなるポリヌクレオチド。

【請求項 21】請求項 3 記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする請求項 1 記載のレセプター蛋白質の mRNA の定量方法。

【請求項 22】請求項 9 記載の抗体を用いることを特徴とする請求項 1 記載のレセプター蛋白質の定量方法。

【請求項 23】請求項 21 または請求項 22 記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプターの機能が関連する疾患の診断剤

【請求項 2 4】請求項 2 1 または請求項 2 2 記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプターの発現を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 2 5】請求項 2 4 記載のスクリーニング方法を用いて得られる請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプターの発現を変化させる化合物またはその塩。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト（ヒト海馬）由来の新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩およびそれをコードする DNA に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質のうち多くは共役している guanine nucleotide-binding protein（以下、G 蛋白質と略称する場合がある）の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また 7 個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G 蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは 7 回膜貫通型レセプター蛋白質（7 TMR）と総称される。

G 蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。レセプターは生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。

各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特に G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

【0003】

例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれている。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内には未だ未知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプター蛋白質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセプター蛋白質にいてもサブタイプが存在するかどうかについても分かっていないものが多い。

生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST) としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

従来、G蛋白質共役型レセプターと生理活性物質（即ち、リガンド）との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質（即ち、リガンド）と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品として活用されてきた。従って、このように生体内での生理発現において重要であるばかりでなく、医薬品開発の標的ともなりうるG蛋白質共役型レセプター蛋白質を新規に見出し、その遺伝子（例えばcDNA）をクローニングすることは、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の特異的リガンドや、アゴニスト、アンタゴニストを見出す際に、非常に重

要な手段となる。

しかし、G蛋白質共役型レセプターはその全てが見出されているわけではなく、現時点でもなお、未知のG蛋白質共役型レセプター、また対応するリガンドが同定されていない、いわゆるオーファンレセプターが多数存在しており、新たなG蛋白質共役型レセプターの探索および機能解明が切望されている。

G蛋白質共役型レセプターは、そのシグナル伝達作用を指標とする、新たな生理活性物質（即ち、リガンド）の探索、また該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニスト）の探索に有用である。一方、生理的なリガンドが見出されなくても、該レセプターの不活化実験（ノックアウト動物）から該レセプターの生理作用を解析することにより、該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニストを作製することも可能である。これら該レセプターに対するリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストなどは、G蛋白質共役型レセプターの機能不全に関連する疾患の予防／治療薬や診断薬として活用することが期待できる。

さらにまた、G蛋白質共役型レセプターの遺伝子変異に基づく、生体での該レセプターの機能の低下または昂進が、何らかの疾患の原因となっている場合も多い。この場合には、該レセプターに対するアンタゴニストやアゴニストの投与だけでなく、該レセプター遺伝子の生体内（またはある特定の臓器）への導入や、該レセプター遺伝子に対するアンチセンス核酸の導入による、遺伝子治療に応用することもできる。この場合には該レセプターの塩基配列は遺伝子上の欠失や変異の有無を調べるために必要不可欠な情報であり、該レセプターの遺伝子は、該レセプターの機能不全に関与する疾患の予防／治療薬や診断薬に応用することもできる。

本発明は、上記のように有用な新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質を提供するものである。即ち、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（DNA、RNAおよびそれらの誘導体）を含有するポリヌクレオチド（DNA、RNAおよびそれらの誘導体）、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、該G蛋白質共役型レセ

プター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、該 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物、該 G 蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの決定方法、リガンドと該 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られるリガンドと該 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩、およびリガンドと該 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）もしくは該 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供する。

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、degenerated PCR法によって作成した E S T 情報に基づいて、ヒト（ヒト海馬）由来の新規な G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする c D N A を単離し、その全塩基配列を解析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第 1 ～ 第 7 膜貫通領域が疎水性プロット上で確認され、これらの c D N A にコードされる蛋白質が 7 回膜貫通型の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを確認した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 6 】

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

(2) 上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、

(3) 上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列

を有するポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

(4) DNAである上記(3)記載のポリヌクレオチド、

(5) 配列番号：2で表される塩基配列を有する上記(3)記載のポリヌクレオチド、

(6) 上記(3)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

(7) 上記(6)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、

(8) 上記(7)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、

【0007】

(9) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、上記(2)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、

(10) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である上記(9)記載の抗体、

(11) 上記(9)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(12) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、上記(2)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることにより得られる上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド、

(13) 上記(12)記載のG蛋白質共役型レセプターのリガンドを含有してなる医薬、

(14) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、上記(2)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

(15) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、上記(2)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(16) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、上記(2)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とするリガンドと上記(1

）記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

（ 1 7 ） 上記（ 1 5 ） 記載のスクリーニング方法または上記（ 1 6 ） 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記（ 1 ） 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩

、
（ 1 8 ） 上記（ 1 5 ） 記載のスクリーニング方法または上記（ 1 6 ） 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記（ 1 ） 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（ 1 9 ） 上記（ 3 ） 記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

（ 2 0 ） 上記（ 3 ） 記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列およびその一部を含有してなるポリヌクレオチド、

（ 2 1 ） 上記（ 3 ） 記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする上記（ 1 ） 記載のレセプター蛋白質の mRNA の定量方法、

（ 2 2 ） 上記（ 9 ） 記載の抗体を用いることを特徴とする上記（ 1 ） 記載のレセプター蛋白質の定量方法、

（ 2 3 ） 上記（ 2 1 ） または上記（ 2 2 ） 記載の定量方法を用いることを特徴とする上記（ 1 ） 記載の G 蛋白質共役型レセプターの機能が関連する疾患の診断剤

、
（ 2 4 ） 上記（ 2 1 ） または上記（ 2 2 ） 記載の定量方法を用いることを特徴とする上記（ 1 ） 記載の G 蛋白質共役型レセプターの発現を変化させる（増強または抑制させる）化合物またはその塩のスクリーニング方法、 および、

（ 2 5 ） 上記（ 2 4 ） 記載のスクリーニング方法を用いて得られる上記（ 1 ） 記載の G 蛋白質共役型レセプターの発現を変化させる化合物またはその塩などに関する。

【 0 0 0 8 】

さらには、

(26) 蛋白質が、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～9個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

(27) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(2)記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする上記(14)記載のリガンドの決定方法、

(28) リガンドが例えばアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンである上記(26)記載のリガンドの決定方法、

【0009】

(29) (i) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその

塩または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドとを接触させた場合と、（ii）上記（１）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする上記（１５）記載のスクリーニング方法、

（３０）（i）標識したリガンドを上記（１）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、（ii）標識したリガンドおよび試験化合物を上記（１）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記（２）記載の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの上記（１）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（３１）（i）標識したリガンドを上記（１）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、（ii）標識したリガンドおよび試験化合物を上記（１）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（３２）（i）標識したリガンドを上記（１）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜面分に接触させた場合と、（ii）標識したリガンドおよび試験化合物を上記（１）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜面分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【 0 0 1 0 】

(3 3) (i) 標識したリガンドを上記 (7) 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した G 蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、 (ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記 (7) 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した G 蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(3 4) (i) 上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、 (ii) 上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(3 5) 上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記 (7) 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した G 蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記 (7) 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した G 蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【 0 0 1 1 】

(3 6) 上記 (1) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物

が、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテログアストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンである上記（33）または上記（35）記載のスクリーニング方法、

（37）上記（29）～（36）記載のスクリーニング方法で得られる、リガンドと上記（1）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（38）上記（29）～上記（36）記載のスクリーニング方法で得られる、リガンドと上記（1）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させるの化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

【0012】

（39）上記（1）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする上記（16）記載のスクリーニング用キット、

（40）上記（1）記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする上記（16）記載のスクリーニング用キット、

（41）上記（7）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有することを特徴とする上記（16）記載のスクリーニング用キット、

（42）上記（39）～上記（41）記載のスクリーニング用キットを用いて得

られる、リガンドと上記（１）記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（４３）上記（３９）～上記（４１）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記（１）記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

（４４）上記（９）記載の抗体と、上記（１）記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、上記（２）記載の部分ペプチドまたはそれらの塩とを接触させることを特徴とする上記（１）の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、上記（２）記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量法、

（４５）上記（９）記載の抗体と、被検液および標識化された上記（１）記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、上記（２）記載の部分ペプチドまたはそれらの塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記（１）記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、上記（２）記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記（１）記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、上記（２）記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量法、および

（４６）被検液と担体上に不溶化した上記（９）記載の抗体および標識化された上記（９）記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記（１）記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、上記（２）記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量法などを提供する。

【 0 0 1 3 】

【発明の実施の形態】

本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質（以下、レセプター蛋白質と略記する場合がある）は、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列〔図 1～図 2 中のアミノ酸配列〕と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である。

本発明のレセプター蛋白質は、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット

、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髓細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳室、黒質）、脊髓、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など（特に、脳や脳の各部位）に由来するタンパク質であってもよく、また合成タンパク質であってもよい。

【0014】

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上、最も好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などがあげられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好まし

くは約 0.5 ～ 2 倍) であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

【0015】

また、本発明のレセプター蛋白質としては、①配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、1 ～ 30 個程度、より好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列に 1 または 2 個以上（好ましくは、1 ～ 30 個程度、より好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、1 ～ 30 個程度、より好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

【0016】

本明細書におけるレセプター蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端が N 末端（アミノ末端）、右端が C 末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をはじめとする、本発明のレセプタータンパク質は、C 末端が通常カルボキシル基 ($-COOH$) またはカルボキシレート ($-COO^-$) であるが、C 末端がアミド ($-CONH_2$) またはエステル ($-COOR$) であってもよい。

ここでエステルにおける R としては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくは n-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用される

ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプター蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のレセプタータンパク質には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、N末端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のレセプター蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来（好ましくはヒト海馬由来）のレセプター蛋白質などが用いられる。

【0017】

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、前記した本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のレセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、〔図3〕で示される疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記した本発明のレセプター蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらにも好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。

【0018】

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、前記した本発明のタンパク質のごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のレセプター蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、前記した本発明のタンパク質のごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【 0 0 1 9 】

本発明のレセプター蛋白質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のタンパク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

【 0 0 2 0 】

本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反

応を実施し、目的のタンパク質またはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0021】

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

【0022】

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセ

チル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

【0023】

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素など

の触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタン
スルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれら
の混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン
、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウ
ムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 -20°C
 $\sim 40^{\circ}\text{C}$ の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フ
ェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスル
フィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕
捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられ
る2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファ
ンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオー
ル、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化
ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

【0024】

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護
基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から
適宜選択しうる。

タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末
端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプ
チド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -
アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシル基の保護基
のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を上記したような混合
溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により
得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し
、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製
手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミ
ド体を得ることができる。

タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -
カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タン

パク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることができる。

【0025】

本発明のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法があげられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の前製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0026】

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明のレセプター蛋白質をコードする塩基配列(DNAまたはRNA、好ましくはDNA)を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA、mRNA等

のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（即ち、非コード鎖）であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のレセプター蛋白質のmRNAを定量することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotalRNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプター蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：2で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

【0027】

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et

al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19 ~ 40 mM、好ましくは約 19 ~ 20 mM で、温度が約 50 ~ 70 °C、好ましくは約 60 ~ 65 °C の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mM で温度が約 65 °C の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードする DNA としては、配列番号：2 で表わされる塩基配列を有する DNA などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質をコードする DNA の塩基配列の一部、または該 DNA と相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードする DNA を包含するだけでなく、RNA をも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、G 蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化したあるいは決定された G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA の塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、G 蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の RNA とハイブリダイズすることができ、該 RNA の合成又は機能を阻害することができるか、あるいは G 蛋白質共役型レセプター蛋白質関連 RNA との相互作用を介して G 蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。G 蛋白質共役型レセプター蛋白質関連 RNA の選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、及び G 蛋白質共役型レセプター蛋白質関連 RNA と特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内及び生体外で G 蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療又は診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌク

レオチド、塩基配列又は核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3'端パ lindローム領域、及び3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

【0028】

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリン又はピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー）又は特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリナグや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などがあげられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（又は非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例えば、モノ

サッカライドなど)などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物(例えば、アクリジン、プソラレンなど)を持つもの、キレート化合物(例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など)を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの(例えば、 α アノマー型の核酸など)であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、プリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

【0029】

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド(核酸)は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸(RNA、DNA)である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものがあげられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており。例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Croke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることが

できうる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピッド、コレステロールなど）といった粗水性のものがあげられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロホルメート、コール酸など）があげられる。こうしたものは、核酸の 3' 端あるいは 5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができうる。その他の基としては、核酸の 3' 端あるいは 5' 端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAse などのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものがあげられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基があげられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

【0030】

本発明の部分ペプチドをコードする DNA としては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノム DNA、ゲノム DNA ライブラリー、前記した細胞・組織由来の cDNA、前記した細胞・組織由来の cDNA ライブラリー、合成 DNA のいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より mRNA 画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR 法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードする DNA としては、例えば、（
1）配列番号：2 で表わされる塩基配列を有する DNA の部分塩基配列を有する

DNA、または(2)配列番号：2で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質ペプチドと実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプター蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

【0031】

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチド(以下、本発明のレセプター蛋白質と略記する)を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のレセプター蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のレセプター蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

【0032】

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、MutantTM-G(宝酒造(株))、MutantTM-K(宝酒造(株))などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたレセプター蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有

し、また 3' 末端側には翻訳終止コドンとしての TAA、TGA または TAG を有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成 DNA アダプターを用いて付加することもできる。

本発明のレセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のレセプター蛋白質をコードする DNA から目的とする DNA 断片を切り出し、(ロ) 該 DNA 断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0033】

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19, pSH15)、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neo などが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあげられる。

これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。

宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0034】

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性）等があげられる。特に、CHO（dhfr⁻）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプター蛋白質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0035】

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）, 60巻, 160（1968）〕, JM103〔ヌクイレック・アシッツ・リサーチ,（Nucleic Acids Research）, 9巻, 309（1981）〕, JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Journal of Molecular Biology）〕, 120巻, 517（1978）〕, HB101〔ジャーナル・オブ・モ

レキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

【0036】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO(dhfr⁻)細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

【0037】

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ

・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A) , 69 巻, 2110 (1972) やジーン (Gene) , 17 巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics) , 168 巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) , 194 巻, 182-187 (1991) 、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A) , 75 巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology) , 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコル. 263-267 (1995) (秀潤社発行) 、ヴィロロジー (Virology) , 52 巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地の pH は約 5 ~ 8 が望ましい。

【0038】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 3β -インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 77巻, 4505(1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 81巻, 5330(1984)〕があげられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0039】

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962))に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻,

501(1952)), DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞膜に本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることができる。

【0040】

上記培養物から本発明のレセプター蛋白質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりレセプター蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にレセプター蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるレセプター蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方

法などが用いられる。

【0041】

かくして得られるレセプター蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するレセプター蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のレセプター蛋白質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0042】

本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のレセプター蛋白質等と略記する）に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

【0043】

〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のレセプター蛋白質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバ

ントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化レセプター蛋白質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどがあげられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などがあげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG(好ましくは、PEG1000～PEG6000)が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0044】

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、レセプター蛋白質等抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添

加し、放射性物質や酵素などで標識したレセプター蛋白質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0045】

（b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

【0046】

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（レセプター蛋白質等抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体

に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン 1 に対し、約 0.1 ~ 20、好ましくは約 1 ~ 5 の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約 2 ~ 6 週毎に 1 回ずつ、計約 3 ~ 10 回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0047】

本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードする DNA は、(1) 本発明のレセプター蛋白質に対するリガンド (アゴニスト) の決定、(2) 本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤、(3) 遺伝子診断剤、(4) 本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量、(5) 本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を变化させる化合物 (アゴニスト、アンタゴニストなど) のスクリーニング、(6) 本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を变化させる化合物 (アゴニスト、アンタゴニスト) を含有する各種疾病の予防および/または治療剤、(7) 本

発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の定量、(8) 本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体による中和、(9) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製などに用いることができる。

特に、本発明の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの結合性を変化させる化合物(例、アゴニスト、アンタゴニストなど)をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のレセプター蛋白質、部分ペプチドまたはそれらの塩(以下、本発明のレセプタータンパク質等と略記する場合がある)、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNA(以下、本発明のDNAと略記する場合がある)および本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体(以下、本発明の抗体と略記する場合がある)の用途について、以下に具体的に説明する。

【0048】

(1) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド(アゴニスト)の決定

本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド(アゴニスト)を探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知のリガンド(例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP(バソアク

ティブ インテスティナル ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンなど)の他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど)の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のレセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

【0049】

具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性)を有する化合物 (例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など) またはその塩を決定する方法である。

本発明のリガンド決定方法においては、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該レセプター蛋白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

【0050】

より具体的には、本発明は、①標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋

白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

③標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該レセプター蛋白質またはその塩に対する結合量を測定しすることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

【0051】

④試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。

特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明のレセプター蛋白質に結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。

【0052】

まず、リガンド決定方法に用いるレセプター蛋白質としては、前記した本発明のレセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたレセプター蛋白質が適している。

本発明のレセプター蛋白質を製造するには、前述の発現方法が用いられるが、該レセプター蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には、通常、相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555～19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行うことができる。

【0053】

したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩であってもよいし、該レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。

本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有する細

胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞としては、本発明のレセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約 1 分 ~ 10 分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm ~ 30000 rpm) で通常 30 分 ~ 2 時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

【0054】

該レセプター蛋白質を含有する細胞やその膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する前記の① ~ ③の方法を実施するためには、適当なレセプター蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ など

で標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、MCH、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテステイナル ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンなどが好適である。

【0055】

具体的には、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜面分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の

未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約 0℃ から 50℃、望ましくは約 4℃ から 37℃ で、約 20 分から 24 時間、望ましくは約 30 分から 3 時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいは γ -カウンターで計測する。全結合量 (B) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント (B-NSB) が 0 cpm を越える試験化合物を本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド (アゴニスト) として選択することができる。

【0056】

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する前記の④～⑤の方法を実施するためには、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など) を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質 (例えば、アラキドン酸など) の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP 産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

【0057】

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合するリガンド決定用キットは、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白

質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものがあげられる。

1. リガンド決定用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径 $0.45\ \mu\text{m}$ のフィルターで濾過滅菌し、 4°C で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、 37°C 、5% CO_2 、95% air で2日間培養したもの。

③標識試験化合物

市販の [^3H]、[^{125}I]、[^{14}C]、[^{35}S] など で標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものを 4°C あるいは -20°C にて保存し、用時に測定用緩衝液にて $1\ \mu\text{M}$ に希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを100～1000倍濃い濃度に調製する。

【0058】

2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、 $490\ \mu\text{l}$ の測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を $5\ \mu\text{l}$ 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を $5\ \mu\text{l}$ 加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1% SDSで溶解し、4mlの液体シンチレ

ーター A (和光純薬製) と混合する。

④液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定する。

【0059】

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳 (特に海馬等)、下垂体、脾臓などに特異的に存在する物質などがあげられ、具体的には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、MCH、ニューロペプチド Y、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP (バソアクティブ インテスティナル ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTES など)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニンなどが用いられる。

【0060】

(2) 本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤

上記 (1) の方法において、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、①本発明のレセプター蛋白質または②該レセプター蛋白質をコードする DNA を、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のレセプター蛋白質が減少しているためにリガ

ンドの生理作用が期待できない（該レセプター蛋白質の欠乏症）患者がいる場合に、①本発明のレセプター蛋白質を該患者に投与し該レセプター蛋白質の量を補充したり、②（イ）本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）対象となる細胞に本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるレセプター蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を十分に発揮させることができる。したがって、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医薬として有用である。

本発明のレセプター蛋白質は、G蛋白共役型レセプター蛋白質であるSLC-1受容体またはソマトスタチン受容体タイプ3またはタイプ5（SS5RまたはSS3R）にアミノ酸配列レベルで約60%の相同性が認められる。

本発明の受容体は中枢疾患（例えばアルツハイマー病・痴呆・摂食障害（拒食症）・てんかんなど）、ホルモン系の疾患（例えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など）、肝/胆/脾/内分泌疾患（例えば糖尿病・摂食障害など）、炎症性疾患（アレルギー・喘息・リュウマチなど）、循環器疾患（例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等）の予防および／または治療に有用である。

本発明のレセプター蛋白質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、①本発明のレセプター蛋白質または②該レセプター蛋白質をコードす

るDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明のレセプター蛋白質または②該レセプター蛋白質をコードするDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0061】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0062】

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイ

ンなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

本発明のレセプター蛋白質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、拒食症患者(60 kgとして)においては、一日につき約0.1 mg~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、拒食症患者(60 kgとして)においては、一日につき約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、拒食症患者(60 kgとして)においては、一日につき約0.1 mg~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、拒食症患者(60 kgとして)においては、一日につき約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0063】

(3) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物

(例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(ゲノミックス(Genomics), 第5巻, 874~879頁(1989年)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユエスエー(Proceedings of the Natinal Academy of Sciences of the United States of America), 第86巻, 2766~2770頁(1989年))などにより実施することができる。

【0064】

(4) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法

本発明のレセプター蛋白質等は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。

本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のレセプター蛋白質等と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)

②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)

【0065】

(5) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を变化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニストなど)のスクリーニング方法

本発明のレセプター蛋白質等を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を变化させる化合物

(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など) またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

このような化合物には、(イ) G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を有する化合物(いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト)、(ロ)該細胞刺激活性を有しない化合物(いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト)、(ハ)リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは(ニ)リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物などが含まれる(なお、上記(イ)の化合物は、前記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい)。

すなわち、本発明は、(i)本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩と、リガンドとを接触させた場合と(ii)本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、(i)と(ii)の場合における、例えば、該レセプター蛋白質等に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

【0066】

より具体的には、本発明は、

①標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識したリガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【 0 0 6 7 】

④本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現し

た本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0068】

本発明のレセプター蛋白質等が得られる以前は、G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いてG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する方法が採られていた。しかし、細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難であった。

しかしながら、例えば、本発明のレセプター蛋白質を用いることによって、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴニストかを簡便に評価することができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のレセプター蛋白質等としては、前記した本発明のレセプター蛋白質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のレセプター蛋白質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、スクリーニングに用いる大量のレセプター蛋白質を得るには、組換え体を用いて大量発現させたレセプター蛋白質等などが適している。

【0069】

本発明のレセプター蛋白質等を製造するには、前述の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい

。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含むものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質等であってもよいし、該レセプター蛋白質等を含む細胞を用いてもよく、また該レセプター蛋白質等を含む細胞の膜画分を用いてもよい。

【0070】

本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含む細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質等を含む細胞としては、該レセプター蛋白質等を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画

法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500 rpm～3000 rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000 rpm～30000 rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプター蛋白質等を含有する細胞や膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0071】

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、例えば、適当なレセプター蛋白質画分と、標識したリガンドが必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたリガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリスー塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王ーアトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバ

ッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的で PMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01 ml～10 ml の該レセプター溶液に、一定量（5000 cpm～50000 cpm）の標識したリガンドを添加し、同時に 10^{-4}M ～ 10^{-10}M の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約 0℃ から 50℃、望ましくは約 4℃ から 37℃ で、約 20 分から 24 時間、望ましくは約 30 分から 3 時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたは γ -カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント (B_0) から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント ($B_0 - \text{NSB}$) を 100% とした時、特異的結合量 ($B - \text{NSB}$) が、例えば、50% 以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0072】

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物スクリーニングする前記の④～⑤の方法を実施するためには、例えば、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なって

もよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なレセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のレセプター蛋白質等を発現した細胞としては、天然型の本発明のレセプター蛋白質等を有する細胞株、前述の組換え型レセプター蛋白質等を発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0073】

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のレセプター蛋白質等、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものがあげられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識リガンド

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] など標識したリガンド 水

溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μMに希釈する。

④リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含むPBSで1 mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

【0074】

2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1 mlで2回洗浄した後、490 μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

② $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5 μl加えた後、標識リガンドを5 μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3} Mのリガンドを5 μl加えておく。

③反応液を除去し、1 mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2 N NaOH-1% SDSで溶解し、4 mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

【0075】

〔数1〕

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B_0 : 最大結合量

【0076】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) G蛋白質共役型レセプ

ターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）リガンドと本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のレセプター蛋白質等に対するアンタゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

【0077】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明の DNA を含有する医薬と同様に、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、

懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、拒食症患者（60 kg として）においては、一日につき約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、拒食症患者（60 kg として）においては、一日につき約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

【0078】

（6）本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

本発明のレセプター蛋白質は前述のとおり、例えば中枢機能など生体内で重要な役割を果たしている。従って、本発明のレセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経

口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【 0 0 7 9 】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 8 0 (TM)、HCO-5 0）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【 0 0 8 0 】

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、拒食症患者（60 kg として）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、拒食症患者（60 kg として）においては、一日につき約0.01～30 mg 程度、好ましくは約0.1～20 mg 程度、より好ましくは約0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

【0081】

(7) 本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の定量

本発明の抗体は、本発明のレセプター蛋白質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化レセプター蛋白質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化レセプター蛋白質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量法、

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量法を提供する。

上記(ii)においては、一方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等のC端部に反応する抗体であることが好ましい。

【 0 0 8 2 】

本発明のレセプター蛋白質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のレセプター蛋白質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分を用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、レセプター蛋白質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体－抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β －ガラクトシダーゼ、 β －グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン－アビジン系を用いることもできる。

【 0 0 8 3 】

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のレセプター蛋白質量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。

また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法によるレセプター蛋白質等の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体はレセプター蛋白質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、レセプター蛋白質のＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

【 0 0 8 4 】

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と（Ｆ）と抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ，Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第１抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものを用い第２抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗

体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0085】

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のレセプター蛋白質またはその塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンジモロジー (Methods in ENZYMOLOGY)」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照〕。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質またはその塩を感度良く定量することができる。

さらに、本発明の抗体を用いて、生体内での本発明のレセプター蛋白質またはその塩を定量することによって、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する各種疾患の診断をすることができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のレセプター蛋白質等を特異的に検出するために使用することができる。また、本発明のレセプター蛋白質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のレセプター蛋白質等の検出、被検細胞内における本発明のレセプター蛋白質の挙動の分析などのために使用することができる。

【0086】

(8) 本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体による中和

本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体が、それらレセプター蛋白質などに対する中和活性とは、即ち、該レセプター蛋白質の関与するシグナル伝達機能を不活性化する活性を意味する。従って、該抗体が中和活性を有する場合は、該レセプター蛋白質の関与するシグナル伝達、例えば、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を不活性化することができる。従って、該レセプター蛋白質の過剰発現などに起因する疾患の予防および／または治療に用いることができる。

(9) 本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA を有する動物の作製

本発明の DNA を用いて、本発明のレセプター蛋白質等を発現するトランスジェニック動物を作製することができる。動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する）があげれるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。

本発明の DNA を対象動物に転移させるにあたっては、該 DNA を動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明の DNA を転移させる場合、これと相同性が高い動物由来の本発明の DNA を動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵

ヘマイクロインジェクションすることによって本発明のレセプター蛋白質等を高産生するDNA転移動物を作成できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現するNGF遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。

【0087】

受精卵細胞段階における本発明のDNAの転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明のレセプター蛋白質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有する。

本発明のDNA転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明のDNAが転移された動物は、本発明のレセプター蛋白質等が高発現させられているので、本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

本発明のDNA転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA転移マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明のレセプター蛋白質が存在する組織を分析することにより、本発明のレセプター蛋白質等について分析することができる。本発明のレセプター蛋白質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のレセプター蛋白質等

を単離精製することも可能である。

【0088】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム

【0089】

Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン

Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
pGlu	: ピログルタミン酸
Me	: メチル基
Et	: エチル基
Bu	: ブチル基
Ph	: フェニル基
TC	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

【0090】

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

Tos	: p-トルエンスルフォニル
CHO	: ホルミル
Bzl	: ベンジル
Cl ₂ Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
Bom	: ベンジルオキシメチル
Z	: ベンジルオキシカルボニル

C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
B o c	: t-ブトキシカルボニル
D N P	: ジニトロフェノール
T r t	: トリチル
B u m	: t-ブトキシメチル
F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
H O O B t	: 3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1,2,3-ベンゾトリアジン
H O N B	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
D C C	: N、N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

【0091】

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

本発明のヒト海馬由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質hSLTのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト海馬由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質hSLTをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

本発明のヒト海馬由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質hSLTをコードするcDNAをクローニングするために使用したプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

本発明のヒト海馬由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質hSLTをコードするcDNAをクローニングするために使用したプライマー2の塩基配列を示す。

後述の実施例1で得られたEscherichia coli DH5α/pCR3.1-hS

LTは、平成11年4月28日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM BP-6710として、平成11年4月20日から財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IFO 16284として寄託されている。

【0092】

【実施例】

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング(Molecular cloning)に記載されている方法に従った。

【0093】

実施例1 ヒト海馬のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト海馬cDNA(CLONTECH社)を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1(配列番号:3)およびプライマー2(配列番号:4)を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAの10分の1量を鋳型として使用し、Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)1/50量、プライマー1(配列番号:3)およびプライマー2(配列番号:4)を各0.2 μ M、dNTPs 200 μ M、および酵素に添付のバッファーを加え、25 μ lの液量とした。PCR反応は、①94 $^{\circ}$ C・1分の後、②94 $^{\circ}$ C・20秒、72 $^{\circ}$ C・2分のサイクルを3回、③94 $^{\circ}$ C・20秒、65 $^{\circ}$ C・20秒、68 $^{\circ}$ C・2分のサイクルを3回、④94 $^{\circ}$ C・20秒、58 $^{\circ}$ C・20秒、68 $^{\circ}$ C・2分のサイクルを36回繰り返し、⑤最後に68 $^{\circ}$ C・7分の伸長反応を行った。該PCR反応後の反応産物をTAクローニングキット(Invitrogen社)の処方に従いプラスミドベクターpCR3.1(Invitrogen社)へサブクローニングした。これを大腸菌DH5 α に導入し、cDNAをもつクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した後、個々のクローンの配列を解析した結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNA配列(配列番号:2)を得た。このcDNAより導き出されるアミノ酸配列(配列番号:1を含有する新規G蛋白質共役型レセプター

蛋白質を h S L T と命名し、この形質転換体は大腸菌 (*Escherichia coli*) D H 5 α / p C R 3. 1 - h S L T と命名した。

【0094】

【発明の効果】

本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードするポリヌクレオチド（例えば、DNA、RNA およびそれらの誘導体）は、①リガンド（アゴニスト）の決定、②抗体および抗血清の入手、③組み替え型レセプター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブや PCR プライマーの作成のための試薬、⑦トランスジェニック動物の作製または⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬等として用いることができる。

【0095】

【配列表】

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel G Protein-Coupled Receptor and its DNA

<160> 4

<210> 1

<211> 340

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Asn Pro Phe His Ala Ser Cys Trp Asn Thr Ser Ala Glu Leu Leu

5

10

15

Asn Lys Ser Trp Asn Lys Glu Phe Ala Tyr Gln Thr Ala Ser Val Val

20

25

30

Asp Thr Val Ile Leu Pro Ser Met Ile Gly Ile Ile Cys Ser Thr Gly

35

40

45

Leu Val Gly Asn Ile Leu Ile Val Phe Thr Ile Ile Arg Ser Arg Lys
 50 55 60
 Lys Thr Val Pro Asp Ile Tyr Ile Cys Asn Leu Ala Val Ala Asp Leu
 65 70 75 80
 Val His Ile Val Gly Met Pro Phe Leu Ile His Gln Trp Ala Arg Gly
 85 90 95
 Gly Glu Trp Val Phe Gly Gly Pro Leu Cys Thr Ile Ile Thr Ser Leu
 100 105 110
 Asp Thr Cys Asn Gln Phe Ala Cys Ser Ala Ile Met Thr Val Met Ser
 115 120 125
 Val Asp Arg Tyr Phe Ala Leu Val Gln Pro Phe Arg Leu Thr Arg Trp
 130 135 140
 Arg Thr Arg Tyr Lys Thr Ile Arg Ile Asn Leu Gly Leu Trp Ala Ala
 145 150 155 160
 Ser Phe Ile Leu Ala Leu Pro Val Trp Val Tyr Ser Lys Val Ile Lys
 165 170 175
 Phe Lys Asp Gly Val Glu Ser Cys Ala Phe Asp Leu Thr Ser Pro Asp
 180 185 190
 Asp Val Leu Trp Tyr Thr Leu Tyr Leu Thr Ile Thr Thr Phe Phe Phe
 195 200 205
 Pro Leu Pro Leu Ile Leu Val Cys Tyr Ile Leu Ile Leu Cys Tyr Thr
 210 215 220
 Trp Glu Met Tyr Gln Gln Asn Lys Asp Ala Arg Cys Cys Asn Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Pro Lys Gln Arg Val Met Lys Leu Thr Lys Met Val Leu Val Leu
 245 250 255
 Val Val Val Phe Ile Leu Ser Ala Ala Pro Tyr His Val Ile Gln Leu
 260 265 270
 Val Asn Leu Gln Met Glu Gln Pro Thr Leu Ala Phe Tyr Val Gly Tyr

275 280 285
Tyr Leu Ser Ile Cys Leu Ser Tyr Ala Ser Ser Ser Ile Asn Pro Phe
290 295 300
Leu Tyr Ile Leu Leu Ser Gly Asn Phe Gln Lys Arg Leu Pro Gln Ile
305 310 315 320
Gln Arg Arg Ala Thr Glu Lys Glu Ile Asn Asn Met Gly Asn Thr Leu
325 330 335
Lys Ser His Phe
340

<210> 2

<211> 1023

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

ATGAATCCAT TTCATGCATC TTGTTGGAAC ACCTCTGCCG AACTTTTAAA CAAATCCTGG 60
AATAAAGAGT TTGCTTATCA AACTGCCAGT GTGGTAGATA CAGTCATCCT CCCTTCCATG 120
ATTGGGATTA TCTGTTCAAC AGGGCTGGTT GGCAACATCC TCATTGTATT CACTATAATA 180
AGATCCAGGA AAAAAACAGT CCCTGACATC TATATCTGCA ACCTGGCTGT GGCTGATTTG 240
GTCCACATAG TTGGAATGCC TTTTCTTATT CACCAATGGG CCCGAGGGGG AGAGTGGGTG 300
TTTGGGGGGC CTCTCTGCAC CATCATCACA TCCCTGGATA CTTGTAACCA ATTTGCCTGT 360
AGTGCCATCA TGA CTGTAAT GAGTGTGGAC AGGTACTTTG CCCTCGTCCA ACCATTTTCA 420
CTGACACGTT GGAGAACAAG GTACAAGACC ATCCGGATCA ATTTGGGCCT TTGGGCAGCT 480
TCCTTTATCC TGGCATTGCC TGTCTGGGTC TACTCGAAGG TCATCAAATT TAAAGACGGT 540
GTTGAGAGTT GTGCTTTTGA TTTGACATCC CCTGACGATG TACTCTGGTA TACACTTTAT 600
TTGACGATAA CAACTTTTTT TTTCCCTCTA CCCTTGATTT TGGTGTGCTA TATTTTAATT 660
TTATGCTATA CTTGGGAGAT GTATCAACAG AATAAGGATG CCAGATGCTG CAATCCCAGT 720
GTACCAAAAC AGAGAGTGAT GAAGTTGACA AAGATGGTGC TGGTGCTGGT GGTAGTCTTT 780
ATCCTGAGTG CTGCCCCCTTA TCATGTGATA CAACTGGTGA ACTTACAGAT GGAACAGCCC 840
ACACTGGCCT TCTATGTGGG TTATTACCTC TCCATCTGTC TCAGCTATGC CAGCAGCAGC 900

ATTAACCCCTT TTCTCTACAT CCTGCTGAGT GGAAATTTCC AGAAACGTCT GCCTCAAATC 960
CAAAGAAGAG CGACTGAGAA GGAAATCAAC AATATGGGAA AACTCTGAA ATCACACTTT 1020
TAG 1023

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 3

ATGAATCCAT TTCATGCATC TTGT 24

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 4

CTAAAAGTGT GATTTTCAGAG TGTTT 25

【 0 0 9 6 】

【図面の簡単な説明】

【図 1】 実施例 1 で得られた本発明のヒト海馬由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 h S L T をコードする DNA の塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図 2 に続く）。

【図 2】 実施例 1 で得られた本発明のヒト海馬由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 h S L T をコードする DNA の塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図 1 の続き）。

【図 3】 図 1 ～図 2 に示したアミノ酸配列をもとに作成した、本発明のマウス脾臓由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 h S L T の疎水性プロットを示す。

【書類名】 図面

【図 1】

10	20	30	40	50	60
ATGAATCCAT	TTCATGCATC	TTGTTGGAAC	ACCTCTGCCG	AACTTTTAAA	CAAATCCTGG
METAsnProP	heHisAlaSe	rCysTrpAsn	ThrSerAlaG	luLeuLeuAs	nLysSerTrp
70	80	90	100	110	120
AATAAAGAGT	TTGCTTATCA	AACTGCCAGT	GTGGTAGATA	CAGTCATCCT	CCCTTCCATG
AsnLysGluP	heAlaTyrGl	nThrAlaSer	ValValAspT	hrValIleLe	uProSerMET
130	140	150	160	170	180
ATTGGGATTA	TCTGTTC AAC	AGGGCTGGTT	GGCAACATCC	TCATTGTATT	CACTATAATA
IleGlyIleI	lcCysSerTh	rGlyLeuVal	GlyAsnIleL	euIleValPh	eThrIleIle
190	200	210	220	230	240
AGATCCAGGA	AAAAACAGT	CCCTGACATC	TATATCTGCA	ACCTGGCTGT	GGCTGATTGT
ArgSerArgL	ysLysThrVa	lProAspIle	TyrIleCysA	snLeuAlaVa	lAlaAspLeu
250	260	270	280	290	300
GTCCACATAG	TTGGAATGCC	TTTTCTTATT	CACCAATGGG	CCCGAGGGGG	AGAGTGGCTG
ValHisIleV	alGlyMETPr	oPheLeuIle	HisGlnTrpA	laArgGlyGl	yGluTrpVal
310	320	330	340	350	360
TTTGGGGGGC	CTCTCTGCAC	CATCATCACA	TCCCTGGATA	CTTGTAACCA	ATTGCGCTGT
PheGlyGlyP	roLeuCysTh	rIleIleThr	SerLeuAspT	hrCysAsnGl	nPheAlaCys
370	380	390	400	410	420
AGTGCCATCA	TGACTGTAAT	GAGTGTGGAC	AGGTACTTTG	CCCTCGTCCA	ACCATTTCGA
ScrAlaIleM	ETThrValME	TSerValAsp	ArgTyrPheA	laLeuValGl	nProPheArg
430	440	450	460	470	480
CTGACACGTT	GGAGAACAAG	GTACAAGACC	ATCCGGATCA	ATTGGGCCT	TTGGGCAGCT
LeuThrArgT	rpArgThrAr	gTyrLysThr	IleArgIleA	snLeuGlyLe	uTrpAlaAla
490	500	510	520	530	540
TCCTTTATCC	TGGCATTGCC	TGTCTGGGTC	TACTCGAAGG	TCATCAAATT	TAAAGACGGT
SerPheIleL	euAlaLeuPr	oValTrpVal	TyrSerLysV	alIleLysPh	eLysAspGly

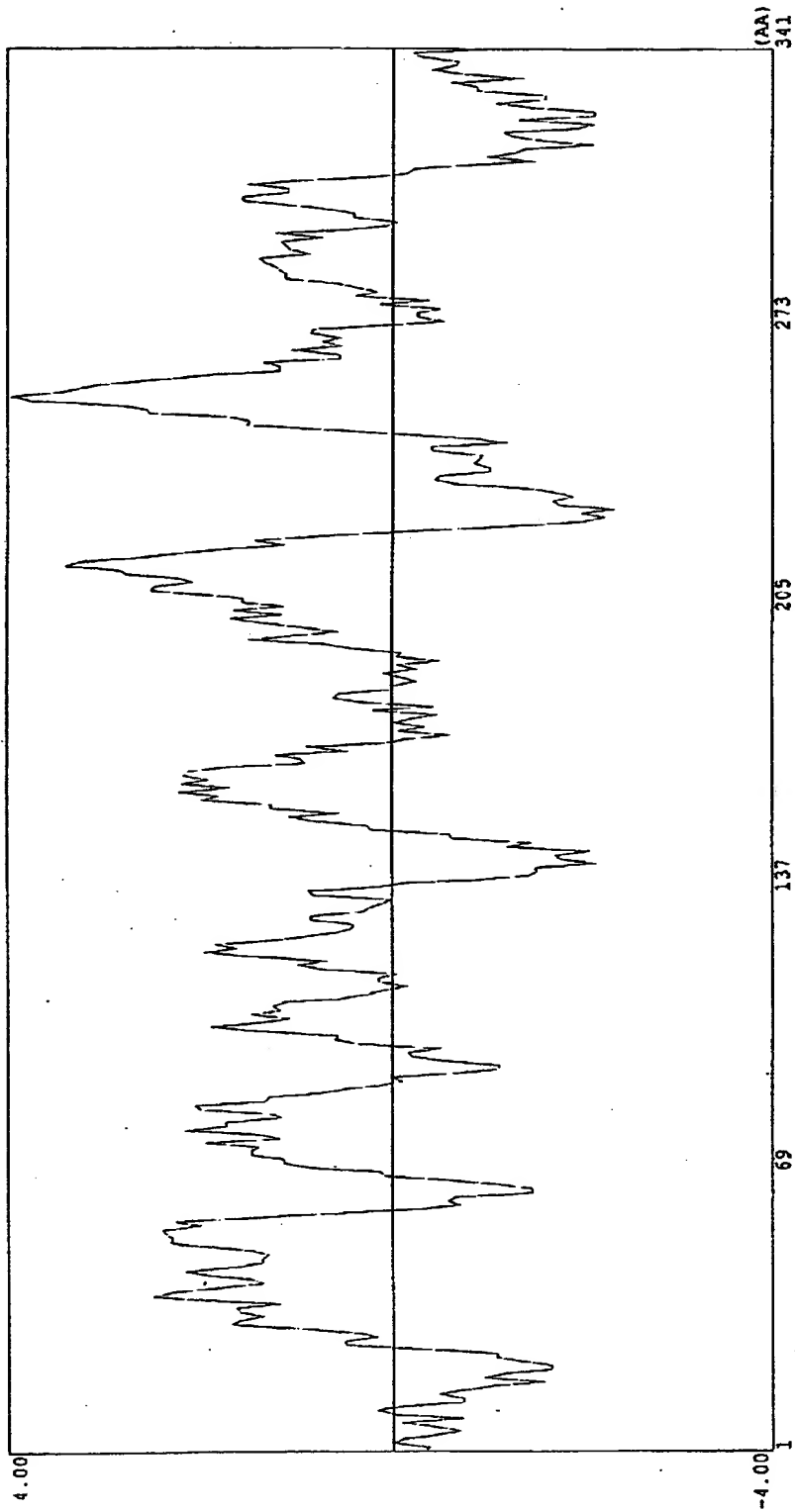
【図 2】

550	560	570	580	590	600
GTTGAGAGTT	GTGCTTTTGA	TTTGACATCC	CCTGACGATG	TACTCTGGTA	TACACTTTAT
ValGluSerC	ysAlaPheAs	pLeuThrSer	ProAspAspV	alLeuTrpTy	rThrLeuTyr
610	620	630	640	650	660
TTGACGATAA	CAACTTTTTT	TTTCCCTCTA	CCCTTGATTT	TGGTGTGCTA	TATTTTAATT
LeuThrIleT	hrThrPhePh	ePheProLeu	ProLeuIleL	euValCysTy	rIleLeuIle
670	680	690	700	710	720
TTATGCTATA	CTTGGGAGAT	GTATCAACAG	AATAAGGATG	CCAGATGCTG	CAATCCCAGT
LeuCysTyrT	hrTrpGluME	TTyrGlnGln	AsnLysAspA	laArgCysCy	sAsnProSer
730	740	750	760	770	780
GTACCAAAAC	AGAGAGTGAT	GAAGTTGACA	AAGATGGTGC	TGGTGTGCGT	GGTAGTCTTT
ValProLysG	lnArgValME	TLysLeuThr	LysMETValL	euValLeuVa	lValValPhe
790	800	810	820	830	840
ATCCTGAGTG	CTGCCCCCTA	TCATGTGATA	CAACTGGTGA	ACTTACAGAT	GGAACAGCCC
IleLeuSerA	laAlaProTy	rHisValIle	GlnLeuValA	snLeuGlnME	TGluGlnPro
850	860	870	880	890	900
ACACTGGCCT	TCTATGTGGG	TTATTACCTC	TCCATCTGTC	TCAGCTATGC	CAGCAGCAGC
ThrLeuAlaP	hcTyrValGl	yTyrTyrLeu	SerIleCysL	euSerTyrAl	aSerSerSer
910	920	930	940	950	960
ATTAACCCTT	TTCTCTACAT	CCTGCTGAGT	GGAAATTTCC	AGAAACGTCT	GCCTCAAATC
IleAsnProP	heLeuTyrIl	eLeuLeuSer	GlyAsnPheG	lnLysArgLe	uProGlnIle
970	980	990	1000	1010	1020
CAAAGAAGAG	CGACTGAGAA	GGAAATCAAC	AATATGGGAA	ACACTCTGAA	ATCACACTTT
GlnArgArgA	laThrGluLy	sGluIleAsn	AsnMETGlyA	snThrLeuLy	sSerHisPhe

1030

TAG

【図 3】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】アゴニスト／アンタゴニストのスクリーニング等に有用な新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の提供。

【解決手段】ヒト由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、該レセプター蛋白質をコードする核酸およびその誘導体、該レセプター蛋白質をコードする塩基配列に対するアンチセンス配列を持つ核酸及びその誘導体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、リガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法／スクリーニング用キット、該スクリーニングで得られる化合物またはその塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体など。

【効果】本発明のヒト（ヒト海馬）由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはそれをコードする核酸及びその誘導体は、（1）本発明のレセプター蛋白質に対するリガンド（アゴニスト／スト）の決定、（2）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤、（3）遺伝子診断剤、（4）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量、（5）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト／スト、アンタゴニストなど）のスクリーニング、（6）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、（7）本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の定量、（8）本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体による中和、（9）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製などに用いることができる。

【選択図】なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000002934]

- | | |
|----------|---------------------|
| 1. 変更年月日 | 1992年 1月22日 |
| [変更理由] | 住所変更 |
| 住 所 | 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 |
| 氏 名 | 武田薬品工業株式会社 |

【書類名】 明細書

【発明の名称】 実立体モデル作成装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 対象物体を複数の方向から撮影し画像データを入力するデータ入力部と、

得られた複数の画像データに基づき、三次元形状データを生成するモデリング部と、

得られた三次元モデルに基づき、実立体モデルを形成する成形部と、
を有し、

実立体モデルを作成する実立体モデル作成装置。

【請求項 2】 対象物体を撮影し、色データを含む画像データを複数入力するデータ入力部と、

三次元形状データ及びこれに関連づけられた色データを生成するモデリング部と、

得られた三次元モデルに基づき、実立体モデルを形成する成形部と、
得られた実立体モデルに上記色データに基づき色づけを行う色づけ部と、
を有し、

色づけされた実立体モデルを作成する実立体モデル作成装置。

【請求項 3】 請求項 2 に記載の装置において、
前記色づけ部は、画像データとして得られた色データの階調を所定の色数に減じる色数削減部を有する実立体モデル作成装置。

【請求項 4】 請求項 2 または 3 に記載の装置において、
前記色づけ部は、
実立体モデルに感光剤を塗布する塗布手段と、
感光剤に前記色データに基づく所定のパターンを照射し、露光する露光手段と、
を有する実立体モデル作成装置。

【請求項 5】 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 つに記載の装置において、
前記データ入力部は、

位置が固定された複数のカメラを有する実立体モデル作成装置。

【請求項 6】 請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 つに記載の装置において、
前記データ入力部は、
対象物体に対し、予め定められたパターンを投影するプロジェクタを有する実
立体モデル作成装置。

【請求項 7】 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 つに記載の装置において、
前記モデリング部は、
加工対象となるワークについて、予め定められた複数の形状のテンプレートを
用意し、得られた三次元データに最も近いテンプレートを利用して、三次元モデ
ルを形成する実立体モデル作成装置。

【請求項 8】 請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 つに記載の装置において、
前記データ入力部で撮影する対象物体は人物であり、
前記成形部は、頭髮部と顔部を分離して作成し、これをあわせて実立体モデル
を形成する実立体モデル作成装置。

【請求項 9】 請求項 8 に記載の装置において、
前記頭髮部及び顔部は、それぞれ予め着色されている実立体モデル作成装置。

【請求項 1 0】 請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 つに記載の装置において、
前記モデリング部は、特徴部分を抽出して、特徴部分を強調した三次元形状デ
ータを得、

前記成形部は、得られた特徴部分が強調された三次元モデルに基づき、実立体
モデルを形成する実立体モデル作成装置。

【請求項 1 1】 請求項 1 ～ 1 0 のいずれか 1 つに記載の装置において、
前記成形部は、深さ方向を圧縮し、厚さの薄い実立体モデルを作成する実立体
モデル作成装置。

【請求項 1 2】 請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 つに記載の装置において、
前記成形部は、切削により実立体モデルを形成する実立体モデル作成装置。

【請求項 1 3】 請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 つに記載の装置において、
前記成形部は、成形型を作成し、この成形型を利用して実立体モデルを形成す
る実立体モデル作成装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、対象物を撮影し、対象物の実立体モデルを作成する実立体モデル作成装置に関する。

【0002】

【従来技術】

従来より、各種の三次元スキャナが知られており、これを利用して各種物体の三次元形状データを得ることができる。また、この三次元形状データに基づいて駆動される切削マシンがあり、これを利用すれば三次元形状モデルを作成することができる。そこで、人物や、胸像などの対象物体に、レーザ光を照射して、三次元形状データを得、これに基づいて、対象物体を切削マシンにより作成するシステムが知られている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、レーザ光を対象物体上にスキャンして三次元形状データを得る手法では、スキャンにかなりの時間がかかりその間対象物体が静止している必要がある。そこで、人物などの三次元データを得るのは、難しいという問題があった。また、レーザ光は、これを人物などに照射した場合、必ずしも安全とはいえないという問題もあった。

【0004】

本発明は上記課題に鑑みなされたものであり、実立体モデルを効果的に作成できる実立体モデル作成装置を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明に係る実立体モデル作成装置は、カメラを用いて対象物体を複数の方向から撮影し画像データを入力するデータ入力部と、得られた複数の画像データに基づき、三次元形状データを生成するモデリング部と、得られた三次元モデルに基づき、実立体モデルを形成する成形部と、を有し、実立体モデルを作成する。

このように、カメラを利用して、対象物体の画像データを得る。このため、複数の画像データを短時間で、得ることができる。また、カメラで撮影するため、対象物体が人物などでも、安全にその画像データを得ることができる。そして、得られた画像データに基づいて、実立体モデルを作成することができる。

【0006】

また、本発明に係る実立体モデル作成装置対象物体を複数の方向から撮影し、色データを含む画像データを複数入力するデータ入力部と、得られた複数の画像データに基づき、三次元形状データ及びこれに関連づけられた色データを生成するモデリング部と、得られた三次元モデルに基づき、実立体モデルを形成する成形部と、得られた実立体モデルに上記色データに基づき色づけを行う色づけ部と、を有し、色づけされた実立体モデルを作成する。このように、色づけを行うことにより、実立体モデルを個性豊かなものにできる。また、対象物体の特徴を表現することも容易となる。

【0007】

また、前記色づけ部は、画像データとして得られた色データの階調を所定の色数に減じる色数削減部を有する。これによって、対象物に色づけする使用するインクの種類を削減でき、低コストの色づけが可能になる。

【0008】

また、前記色づけ部は、実立体モデルに感光剤を塗布する塗布手段と、感光剤に前記色データに基づく所定のパターンを照射し、露光する露光手段と、を有することが好適である。これによって、高精細な色づけが可能となる。なお、色づけとは白黒の濃淡づけを含む。

【0009】

また、前記データ入力部は、位置が固定された複数のカメラを有する。これによって、対象物体についての複数の画像データを同時に得ることができる。そこで、対象物体が人物や動物のように動きがあるものであっても容易に複数の画像データを得ることができる。

【0010】

また、前記データ入力部は、対象物体に対し、予め定められたパターンを投影

するプロジェクタを有することが好適である。これによって、対象物体の、より正確な形状把握が行える。

【0 0 1 1】

また、前記モデリング部は、加工対象となるワークについて、予め定められた複数の形状のテンプレートを用意し、得られた三次元データに最も近いテンプレートを利用して、三次元モデルを形成することが好適である。テンプレートの利用により、実際の成形の負担が小さくなり、効果的な成形が行える。切削により成形を行う場合には、削りかすの削減もできる。

【0 0 1 2】

また、前記データ入力部で撮影する対象物体は人物であり、前記成形部は、頭髮部と顔部を分離して作成し、これをあわせて実立体モデルを形成することが好適である。頭髮部はある程度固定しており、これを予め用意することができ、製作が容易になる。

【0 0 1 3】

また、前記頭髮部及び顔部は、それぞれ予め着色されていることが好適である。色はある程度決まっており、予め着色しておくことで、その後の色づけが容易になる。特に、頭髮部は、黒色一色にしても問題ない。

【0 0 1 4】

また、前記モデリング部は、特徴部分を抽出して、特徴部分を強調した三次元形状データを得、前記成形部は、得られた特徴部分が強調された三次元モデルに基づき、実立体モデルを形成することが好適である。このようにすることによって、小さな三次元モデルを得る場合などに、特徴を捉えたものを得ることができる。

【0 0 1 5】

また、前記成形部は、深さ方向を圧縮し、厚さの薄い実立体モデルを作成することが好適である。小さな人形などを得る場合には、この方が持ちやすく、また見た目もよい場合も多い。

【0 0 1 6】

前記成形部は、切削により実立体モデルを形成することが好適である。切削に

よれば各種の形状を容易に得ることができる。

【0017】

前記成形部は、成形型を作成し、この成形型を利用して実立体モデルを形成することが好適である。成形型を作成すれば、任意の形状を得ることができ、複数個のモデルを形成することも容易である。また、削りかすなどが発生しないという利点がある。

【0018】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態（以下実施形態という）について、図面に基づいて説明する。

【0019】

図1及び2は、一実施形態に係る実立体モデル作成装置の構成を示す図である。データ入力部10は、例えば人物や人物の顔である対象物体を撮影し、この画像データを生成する。このデータ入力部10は、図2に示すように固定された複数のカラーCCDカメラからなり、複数位置での対象物体のカラー画像データを得る。

【0020】

データ入力部10により得られた色彩情報を含むカラーの画像データは、モデリング部12に入力される。このモデリング部12は、パーソナルコンピュータなどからなり、複数の位置から撮影した対象物体についての複数の画像データに基づいて、三次元モデリングを行い、対象物体の三次元形状データを得る。また、この三次元形状データは、対象物体についての色彩データを含むものである。この三次元モデリングには、例えば特開平10-124704号公報に記載されている手法が用いられる。

【0021】

このようにして得た三次元形状データは、成形部14に入力される。この成形部14は、例えばxyz、3軸移動の切削ドリルであって、これによってワークを切削し、入力されてきた三次元形状データに基づいた三次元形状モデルを作成する。

【0022】

このようにして得られた三次元形状モデルは、色づけ部 16 に供給される。この色づけ部は、三次元形状モデルに色づけを行うもので、対象物体が人物であれば、少なくとも目、口などの色づけを行う。

【0023】

このように、本実施形態においては、カメラを用いて対象物体を撮影し画像データを得る。従って、人物などを対象物体とする場合であっても非常に安全である。また、色彩データを得、これに基づいて色づけ部において色づけする。色情報を持った個性豊かな実立体モデルを作成することができる。

「データ入力部及びモデリング部の構成」

データ入力部 10 は、カメラを用いて対象物体を撮影する。三次元形状データを得るためには、基本的に 1 つの動かない対象物体について、複数の方向からの画像データが必要である。そこで、複数のカメラを予め定められた位置に固定しておき、対象物を同時に撮影することが好適である。しかし、レール上にカメラを移動可能に設置し、カメラを移動して複数の画像データを得てもよい。

【0024】

また、複数のカメラの固定は、絶対位置を確実に検出すればよいが、これは難しい場合も多い。そこで、図 3 に示すように、所定のパターンが描かれた基準物体をカメラ視野に置きこの基準物体の画像データを基に、カメラ位置のキャリブレーションを行うことが好適である。これによって、カメラの取り付け自体は、簡単にして、その位置を正確検出することができる。このキャリブレーションは適当な頻度で、繰り返し行うとよい。

【0025】

また、対象物体における三次元形状データなどを正確に得るためには、対象物体の各部が複数の方向から見たときに変化する必要がある。そこで、図 4 に示すようにプロジェクタを用いて、対象物体に所定のパターンを投影することが好ましい。これによって、平坦で色の変化のないような部分であっても、正確な三次元形状データを得ることができる。なお、このパターンはデータ処理によって、色彩データから除去してもよいし、色彩データはパターンを投影しない場合の撮

影データから得てもよい。この投影パターンとしては、図 5 に示すようなランダムパターンが好適に利用できる。なお、このようなランダムパターンを利用して、三次元データを得る場合、複数のカメラによるステレオ法によって、奥行きデータを得ることで、凹部についても高精度なモデリングが可能になる。

【0026】

また、カメラとしては、広角のレンズのものを利用することが好適である。これによって、比較的小さな空間にカメラを配置することができる。

【0027】

このデータ入力部 10 は、カメラで対象物体を撮影し、その後画像データから対象物体についての部分を抽出する。そこで、背景色を一定のものとして、対象物体部分を切り出しやすくすることが好適である。例えば、一色の四方が取り囲まれた部屋を設け、その中心部に対象物体を載置することが好適である。特に、人物が対象物体である場合には、中心部に椅子を置き、ここに座ってもらうことも好適である。また、人物の場合、後ろからの画像は、比較的重要度が低い。そこで、部屋の 1 側面に入口を設け、この入口に向いて、人物を座らせ、入口側以外の面を同一色とすることが好ましい。そして、人物については、後ろからの画像データは省略することも好適である。

【0028】

さらに、対象物体と背景色が同一色の場合切り出しが困難になる。そこで、背景色（部屋の壁の色）を変更できるようにすることも好適である。例えば、プロジェクタによって、外側から所定の色の光線を投射することによって、壁の色を変更するとよい。

【0029】

さらに、背景の色を少なくとも 2 色変更して、2 種類の背景色での画像データを得、両方の背景色での抽出結果の和集合により、対象物体の部分を切り出すことも好適である。これによって、対象物体がどのような色であっても、確実に対象物体部分の切り出しが行える。

【0030】

さらに、対象物体に対する照明が均一になるように、照明装置を部屋の四隅に

設け、対象物体全体に影ができないように、ライトアップすることが好ましい。

「成形部の構成」

成形部 14 は、三次元形状データに基づいて、実立体モデルを作成する。この成形部 14 には、上述のように三次元加工が可能な切削ドリルが利用できる。対象物体が、人物の顔であれば、ドリルの軸方向を一方向として加工も可能である。しかし、鼻の穴等の加工も確実にを行うためには、ドリル軸方向の回転も行える加工機の方が好ましい。

【0031】

実立体モデルの元になる材料としては、角材や、丸棒などが考えられるが、人物の顔など対象物体がある程度特定されている場合には、その形状に近いテンプレート（加工対象となるワークの原型）を用意しておき、これを加工することが好適である。これによって、加工に要する時間を短縮することができる。さらに、図6に示すように、テンプレートを複数種類用意しておき、得られた三次元形状データに近いテンプレートを選択し、これを加工することがさらに好適である。図6の例では、丸顔の人用のテンプレートと細長の顔のテンプレートを別に用意しておき、対象となった人が丸顔であった場合にそのテンプレートを選択し、加工する。これによって、加工を容易にし、加工時間のさらなる短縮を図ることができる。また、このように、テンプレートを持つことで、削りかすの量も減少できる。さらに、選択されたテンプレートの形状に近づくように、得られた三次元形状をモーフィングすることで変形した後、テンプレートを加工することで、より加工時間を短縮できる。

【0032】

さらに、頭髮部分に関しては、成形せずに予め用意されたテンプレートをそのまま利用することも可能である。すなわち、頭髮部分は、それ程重要でなく、ある程度の種類があれば、問題がない場合も多い。そこで、この部分を複数種類予め用意しておき、その中から選択して、採用することができる。もちろん、頭髮部分のテンプレートと顔部分のテンプレートとは分離して準備しておいてもよい。

【0033】

この場合、頭髮部分のテンプレートは、黒色に始めからしておくこともできる。これによって、頭髮部分については色づけが省略できる。また、色づけを行うにしても、頭髮部分の色づけを別に行うことで、その色づけが全体として容易となる。なお、頭髮部分は、かつらと同様に顔の部分に上部にかぶせるようにして全体を形成することが好適である。また、頭髮部分は糸を頭髮としたかつら状のものにしてもよい。

【0034】

また、成型型を作成し、これを用いて実立体モデルを作成することも好適である。図7に、フレキシブルフィルム30とピン山32を利用した成型型を示す。ピン山32は、多数のピン34から構成されており、その1つ1つが移動自在、かつ固定自在になっている。そこで、図に示しように、アクチュエータで1つまたは複数のピン36の位置を決定し、これをフレキシブルフィルム30を押し当てて、ピン山32のそれぞれのピン34の位置をセットすることができる。そして、ピン山32の形状が決まれば、それをカバーするフレキシブルフィルム30の形状が決定される。そこで、ピン34の位置を固定したピン山32とフレキシブルフィルム30で決定されたものを成型型として、ここに材料を充填し、固化させることで、実立体モデルを作成することができる。このように、型を形成することで、複数個の実立体モデルの作成も容易である。

【0035】

例えば、フレキシブルフィルム30を耐熱性のフィルムとすれば、熱硬化性の樹脂などを材料として用い加熱成形することができる。

【0036】

また、リセット用板38をピン山32の反対側から押し当てることによって、ピン36によって押されたピン山32のピン34を元の位置に復帰させることができ、次の成形に備えることができる。なお、対象物体が人の顔などある程度決まった形状であれば、リセット用板38をこれに対応した形状にしておき、ピン山32のデフォルト形状を最終形状に近いものにするのも好ましい。また、ピン山32のピン34は、すべて同一方向に向くことはなく、予め曲面を支持するように各ピンに軸方向を変更して配置してもよい。

【 0 0 3 7 】

図 7 の例では、ピンを従動的に移動させたが、図 8 に示すように、アクチュエータ 4 0 を各ピン 3 4 に対応して設けピン山 3 2 の形状を複数のアクチュエータ 4 0 の駆動によって制御することもできる。この場合もピン 3 4 の上面にフレキシブルフィルム 3 0 を設けることが好適である。

【 0 0 3 8 】

さらに、図 9 に示したのは、各ピン 3 4 を球面に対応して設けたものである。このように配置することによって、各ピン 3 4 は半径方向外側に延び、そこにアクチュエータ 4 0 が配置される。そこで、各アクチュエータ 4 0 の配置スペースを大きくとることができ、かつ各ピン 3 4 の先端の密度を大きくとることができる。また、人の顔などは、元々球面に近いため、このような配置が好適である。また、ピン 3 4 の先端を合わせた形状は、完全な球面にする必要はなく、対象物体の形状に応じて適切な配置にすることができる。

【 0 0 3 9 】

この構成によっても、アクチュエータ 4 0 の個別の駆動によって、ピン 3 4 の先端の位置を個別に決定し、これらで支持されるフレキシブルフィルム 3 0 の形状を所望のものにすることができ、所望の実立体モデルの成形を達成することができる。

【 0 0 4 0 】

また、成形する際には、三次元形状データをそのまま用いず、奥行き方向に圧縮して、実立体モデルを作成してもよい。これによって、レリーフ的な実立体モデルを形成することができる。また、レリーフ的な実立体モデルは、その成形が容易であり、切削機を利用した場合の削りかすを減少することもできる。

【 0 0 4 1 】

また、特徴部分を抽出して、成形することも好適である。例えば、三次元形状データについてエッジ強調処理を施すことで、三次元形状データについての特徴部分の強調ができる。そこで、このような特徴部分を強調した実立体モデルの作成によって、対象物体の特徴を捉えた実立体モデルを作成することができる。

【 0 0 4 2 】

また、粘土などを用いて成形型を作成することもできる。この場合、粘土などは再利用するとよい。

「色づけ部の構成」

色づけ部 1 6 は、色彩データに基づき実立体モデルに色づけを施す。この色づけとしては、各種の方法があるが、これについて以下に説明する。

【0 0 4 3】

まず、実立体モデルにレジストを塗布し、これを利用して色づけすることができる。これについて、図 1 0 に基づいて説明する。まず、実立体モデルの表面にレジストを塗布する (S 1 1)。対象物体が人の顔の場合、顔のみを色づけすればよく、この場合には顔の部分のみが対象になる。次に、所定のパターンで、必要な部分を露光する、あるいはドリルなどで薄く切削することで、この部分のレジストを部分剥離する (S 1 2)。この部分剥離は、一色についての色づけ部分について行う。そして、この剥離部分について一色の色づけを行う (S 1 3)。そして、色づけを全色終了したかを判定し (S 1 4)、終了していなかった場合に S 1 1 に戻り次の色づけを行う。ここで、レジストは、色づけを行う塗料をはじく材質を用いることで、レジストを剥離しない部分のみ色づけすることができる。また、レジストはかなり薄いものであり、剥離しない部分についてはそのまま残しておいて問題ない。すべての色づけが終了した場合に、全体を耐久性のある保護膜などで覆うことも好適である。また、この方法では、色の種類はなるべく少ない方がよい。そこで、人の顔であれば、目を黒で色づけし、唇を赤で色づけするなど、ある程度単純化することが好ましい。

【0 0 4 4】

また、上記の色づけ手法を用いる場合、対象物に色づけする際の色数に制限が発生する。したがって、得られた画像データに含まれるもともとの色データに対し、色数の削減処理が必要になる。例えば、以下のステップを経ることで、公的な削減が可能となる。

- 1 : 得られた画像データに対し、領域分割を施す。
- 2 : 同じ領域内の色の平均値を得る。
- 3 : 各領域について、上記色の平均値と、予め指定された使用可能色すべてとを

比較し、最も近い使用可能色を得る。

4：この領域の色を全て3で求めた使用可能色に置き換える。

【0045】

また、感光剤を利用して、色づけを行うことが好適である。これについて、図11に基づいて説明する。まず、実立体モデルに感光剤を塗布する(S21)。そして、色彩データに基づきパターンを照射し、感光剤を感光する(S22)。次に、感光剤について定着処理し、色を定着する(S23)。ここで、パターンの照射は、図12に示すように、光源からの光を投射パターンを介し感光剤を塗布した実立体モデル(立体物)に照射すればよい。この投射パターンは、例えば透過型の液晶パネルを利用することができる。なお、CRTより直接パターンを実立体モデルに照射することもできる。この例では、実立体モデルは顔であり、正面からの一回の照射で感光を行う。特に、長焦点レンズを用い、立体物でも十分な焦点深度を確保することで、1つの投射パターンを利用して、顔の部分全体(半周部)の露光を行うことができる。

【0046】

なお、奥行き方向を圧縮し実立体モデルをレリーフ状とした場合には、この感光の場合にも均一な感光を達成しやすい。また、感光剤としては、臭化銀、塩化銀、ヨウ化銀などのハロゲン化銀を用いることができる。これら感光剤は、実立体モデルの表面に塗布、乾燥させた後、露光する。

【0047】

実立体モデルは立体物であり、表面の向きにより十分均一な感光ができない場合も多い。そこで、図13に示すように、複数の投射パターンを実立体モデルの表面の方向に対応して設け、複数の方向から感光剤を感光することも好適である。この場合、複数の投射パターンからの光が重畳される部分について光量が多くなりすぎないように、マスキングを行うことが好適である。この場合、光源、投射パターンの位置を固定としておき、実立体モデルに応じて、マスキングを可変とすることが好適である。

【0048】

さらに、色づけを全体に行った後不要部分を剥離することも好適である。すな

わち、図 14 に示すように、実立体モデルに色づけする (S31)。次に不要部分をドリルなどで剥離する (S32)。このようにして、必要部分のみの色づけが行える。例えば、図 15 に示すように、人物の頭部について、口より上の部分を原材料自体の色を黒としておき、口より下の部分を赤にしておく。そして、全体に肌色の塗料を塗布する。そして、目、頭髮部分、口の部分の塗料を切削除去することで、黒の目及び頭髮部分、赤の唇が形成される。

【0049】

また、図 16 に示すように、熱収縮性のフィルムにパターンをプリントし、これを実立体モデルに貼り付けることも好適である。この場合、プリントの際に、形状から収縮率を計算し、より収縮率の高いところほど色を薄くしてプリントしておく必要がある。これによって、収縮後の色を正常なものにできる。フィルムを伸ばすと色割れなどの問題が生じるが、収縮であれば、このような心配はなく、より濃い色づけが可能になる。

【0050】

フィルムとしては、ポリ塩化ビニルや、フッ素樹脂形成のフィルムに対し、PVA (ポリビニルアルコール) などの水溶性ポリマーを薄くコーティングし、プリント性を出す (プリントする) ことが好適である。なお、フィルムの代わりに伸縮性のある布を用いてもよい。

【0051】

さらに、次のような色づけも可能である。

【0052】

人物の顔の場合、特徴となるのは、目、口である。そこで、この目、口のみを色づけすることも好適である。この場合、その形状より配置位置の方が特徴を表す場合も多い。そこで、図 17 に示すように、2つの目用スタンプ、1つの口用スタンプを設けておき、これを実立体モデルの表面に押しつけ色づけすることも好適である。この場合、目用スタンプは、顔の横方向に移動可能となっており、口用スタンプは、顔の上下方向に移動可能となっており、スタンプの位置が調節可能になっている。スタンプをスポンジ状の材質等変形可能な物質で形成すれば、表面が平坦でなくても、容易に色づけができる。また、スポンジ状の材質は着

色剤を含ませることが容易である。さらに、目、口などについて、複数種類の形を用意し、最も似ているものを選択し、色づけすることも好適である。また、各色の筆をデータに基づいて駆動して色づけすることも可能である。

【0053】

図18に示すように、インクジェットのノズルを3軸（実立体モデルの回転、ノズルのy, z方向の移動）で駆動することも好適である。これによって、所定の場所に所定の色づけをすることができる。また、図19に示すように、インクジェットのノズルを成形ドリルを有する切削ヘッドと併設することもできる。これによって成形と色づけがほぼ同時にでき制御機構が1つでよいという効果が得られる。なお、一旦成形を行った後、色づけをする場合でも、同一のデータに基づいて同一の動きをすればよいため、効果的な色づけを行うことができる。

【0054】

ワイヤドットと、インクリボンを利用するインパクトドット方式により実立体モデルに色づけすることもできる。

【0055】

さらに、このような色づけの際に、接触ピンセンサで、実立体モデルの表面位置を検出し、これに基づいて色づけすることも好適である。これにより成形の精度が不十分でも正確な色づけが行える。

【0056】

さらに、色付け処理したフィルムで転写することもできる。

「その他」

三次元形状データが得られた段階で、三次元形状を色彩も含めて、ディスプレイに表示し、これから作成される実立体モデルを予め見せることも好適である。圧縮処理や、特徴の強調処理、色の限定などをした場合などは、なるべく最終的にできあがる実立体モデルに近いものを見せることが好適である。

【0057】

さらに、眼鏡、髪型等、実際の対象物体とは異なる各種のオプション品を用意し、これらを装着可能とすることも好適である。

【0058】

また、最終的な実立体モデルは、人物の場合において、頭部のみでもよいし、全体でもよい。例えば、全体の場合、顔が小さくなりすぎるため、2頭身などとするのが好適であり、このようなバリエーションをいくつか容易し、選択可能とすることも好適である。

【0059】

対象物体として犬などのペットを採用する場合、ペットを鎖などにつないでおく必要がある。そこで、撮影場所に鎖を設けておくことが好適である。この場合、鎖の色を背景色と同一にすることで、撮影画像データにおける対象物体の抽出が容易になる。

【0060】

本装置は、1つの装置として一体化して、ゲームセンタなどに設置することが好適である。これによって、ユーザが本装置に入り、写真を撮るのと同様にして画像データが得られる。そして、しばらく待つことにより、実立体モデルの人形が取り出し口に現れる。写真シール等と同様にして、ユーザの人形を作成することができる。また、作成までにある程度の時間が必要であり、カードを発行し、このカードにより人形と引き替えることも好適である。この場合、カードリーダーによりそのユーザの人形を自動的に取り出し口に排出するとよい。

【0061】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明によれば、対象物体についての実立体モデルが自動的に作成される。特に、カメラを利用するため、安全に対象物体の画像データを得ることができる。また、色づけすることで、より対象物の特徴をつかんだ実立体モデルを得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施形態の構成を示すブロック図である。

【図2】 実施形態の構成を示す概念図である。

【図3】 キャリブレーションを示す図である。

【図4】 ランダムパタンの照射の構成を示す図である。

【図5】 ランダムパタンの例を示す図である。

- 【図 6】 テンプレートの利用を示す図である。
- 【図 7】 成形型の構成を示す図である。
- 【図 8】 成形型の他の構成を示す図である。
- 【図 9】 成形型のさらに他の構成を示す図である。
- 【図 1 0】 レジストを用いる色づけを示すフローチャートである。
- 【図 1 1】 感光剤を用いる色づけを示すフローチャートである。
- 【図 1 2】 パタン投射の構成を示す図である。
- 【図 1 3】 パタン投射の他の構成を示す図である。
- 【図 1 4】 不要部分剥離による色づけを示すフローチャートである。
- 【図 1 5】 不要部分剥離による色づけを示す図である。
- 【図 1 6】 熱収縮性フィルムを用いる色づけを示す図である。
- 【図 1 7】 スタンプを用いる色づけを示す図である。
- 【図 1 8】 インクジェットノズルを用いた 3 軸駆動による色づけを示す図である。
- 【図 1 9】 インクジェットノズルと切削ヘッドを併設した例を示す図である。

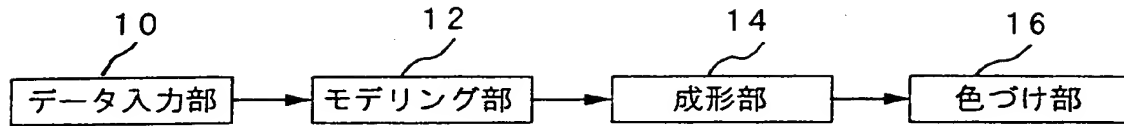
【符号の説明】

1 0 データ入力部、 1 2 モデリング部、 1 4 成形部、 1 6 色づけ部。

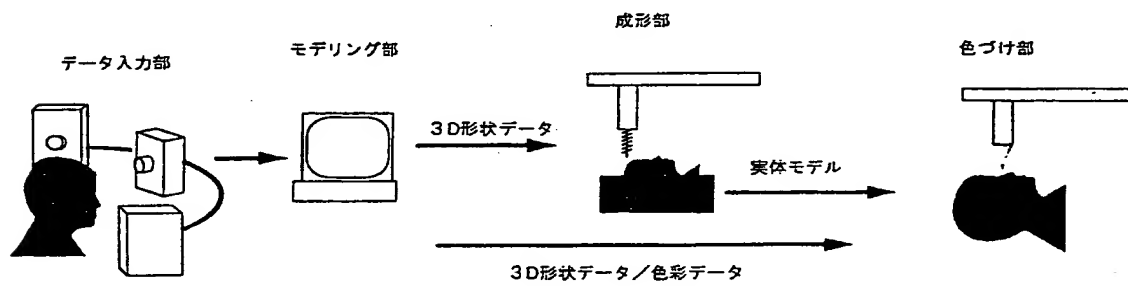
【書類名】 図面

【図 1】

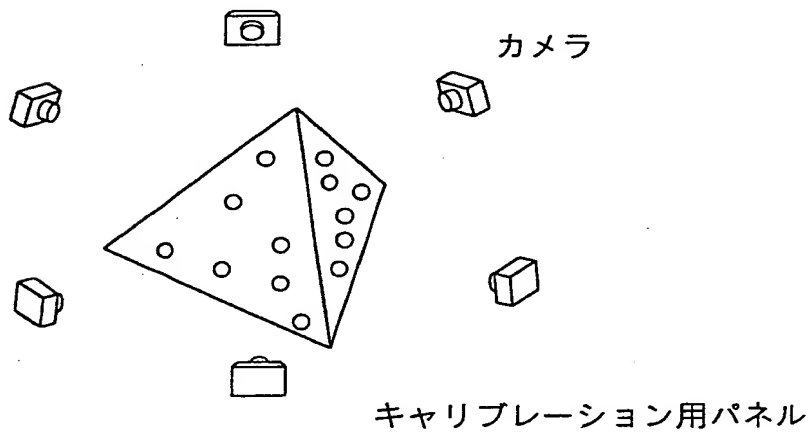
システム構成



【図 2】

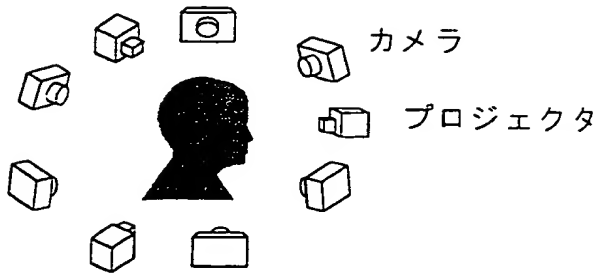


【図 3】



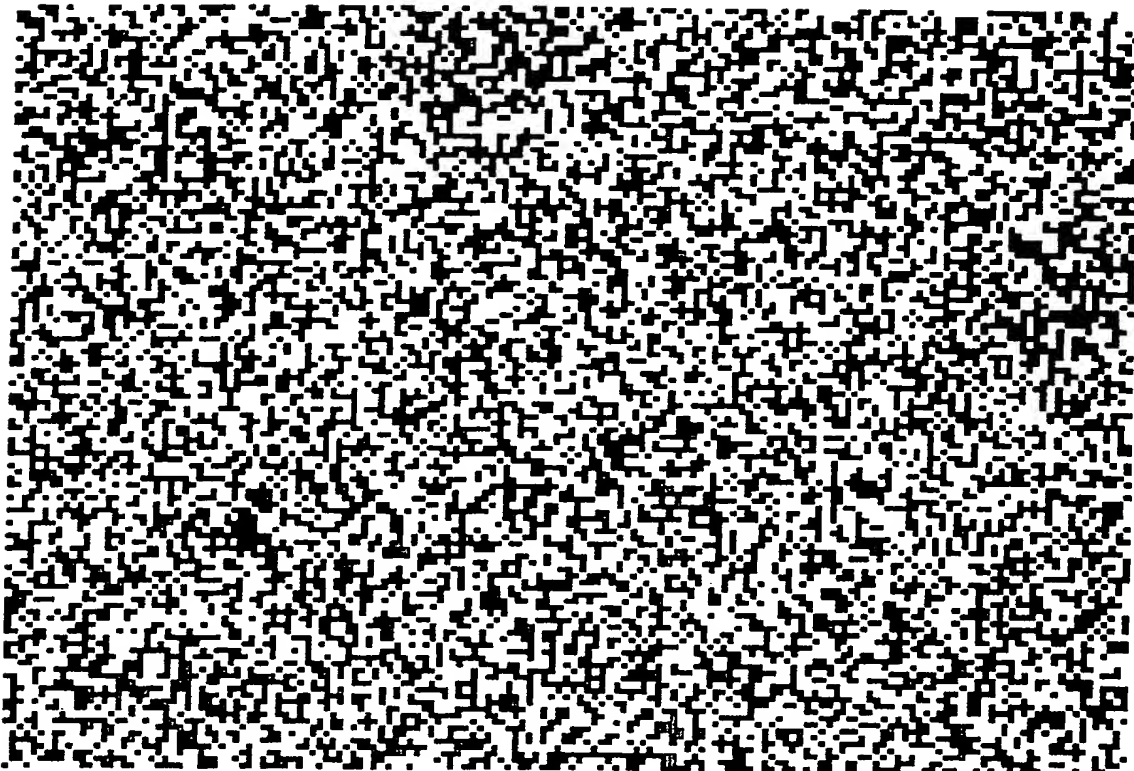
【図 4】

ランダムパターン照射システムの例



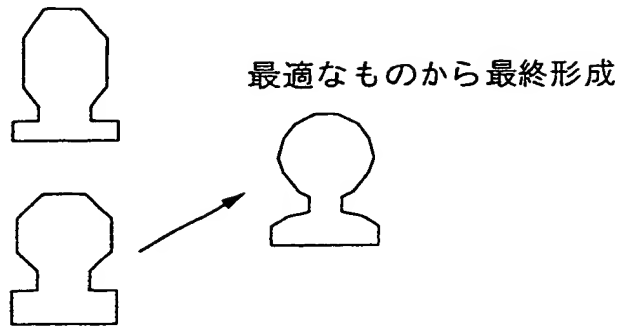
【図 5】

ランダムパタンの例

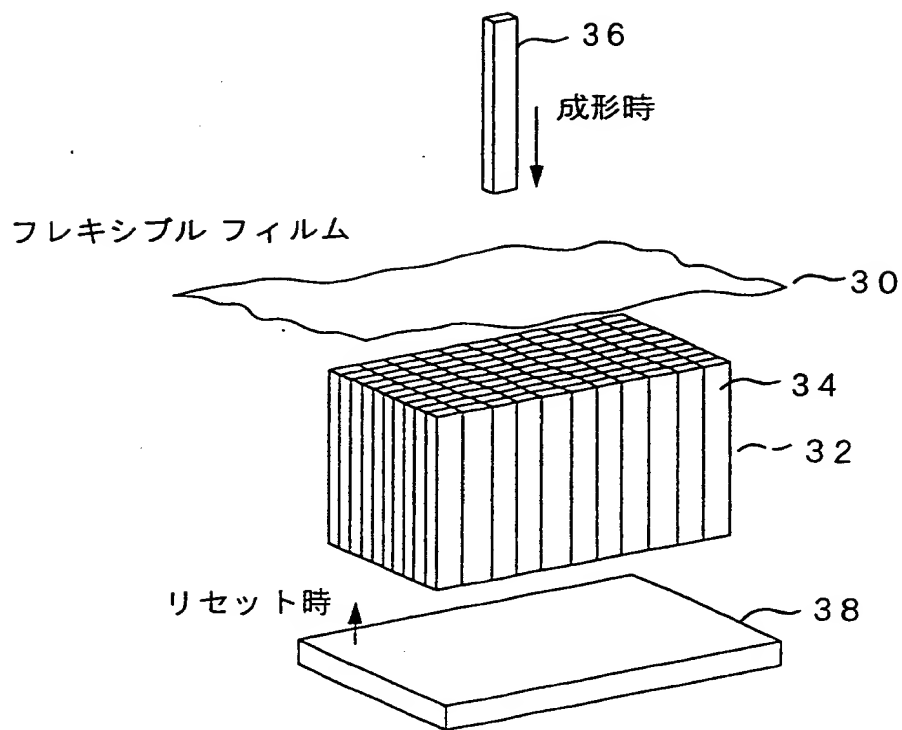


【図 6】

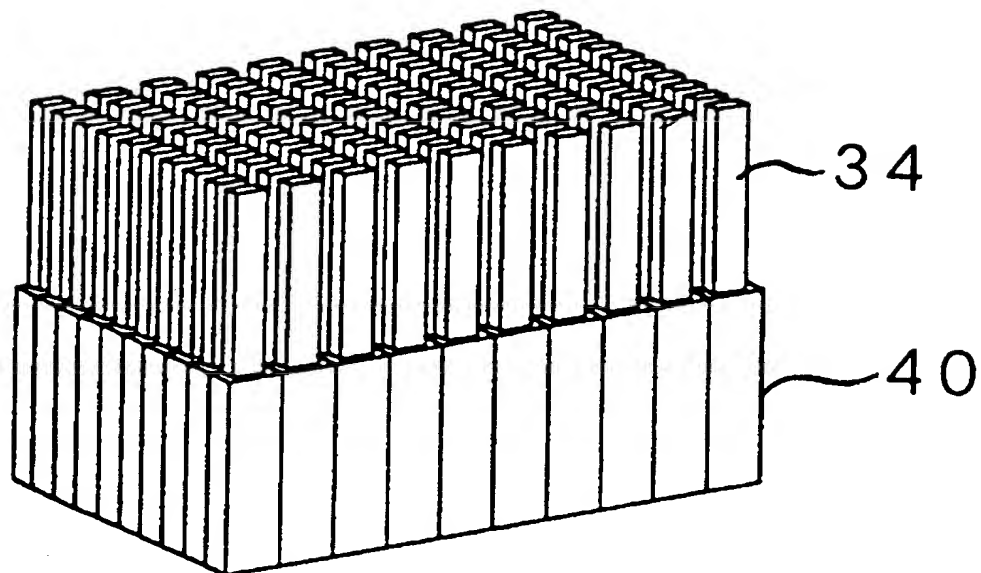
複数テンプレート



【図 7】



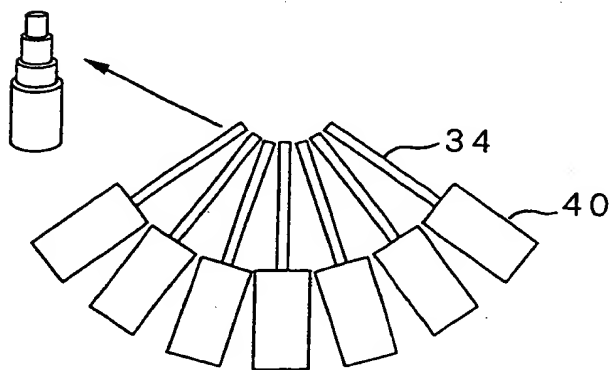
【図 8】



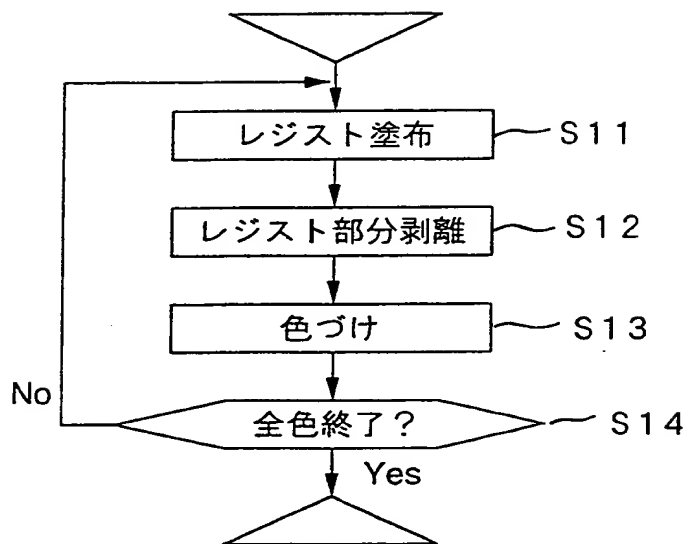
アクチュエータ

【図 9】

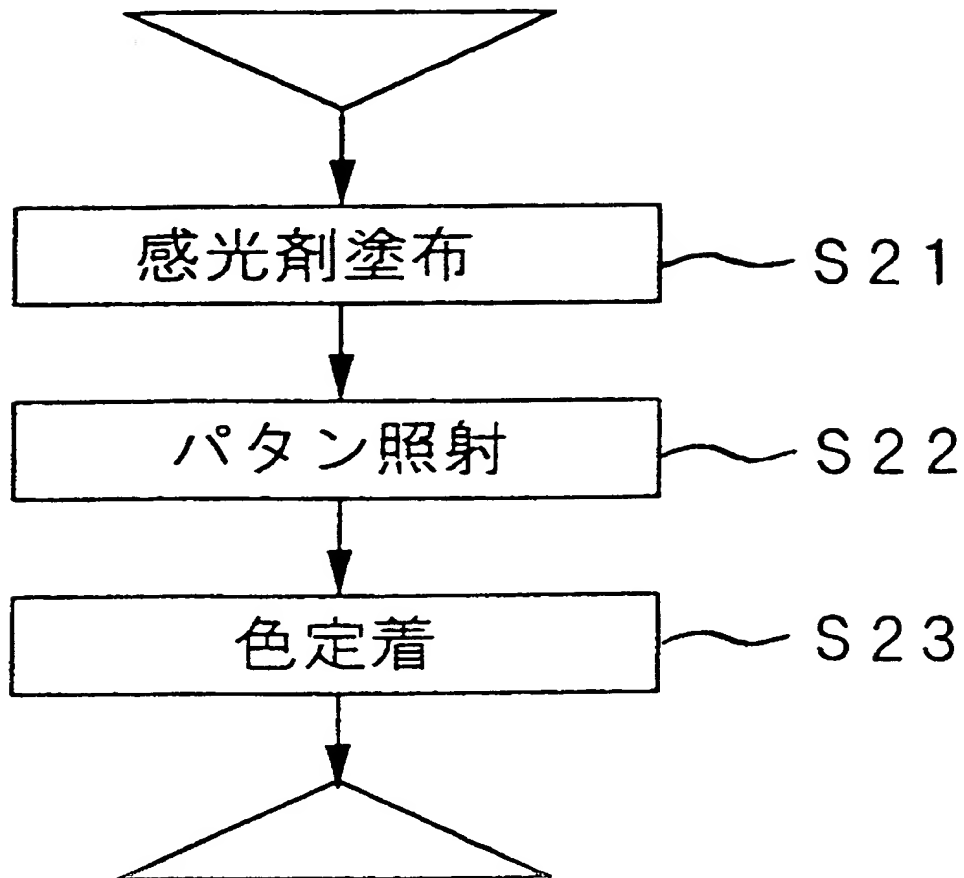
アクチュエータ球状（円筒状）配置



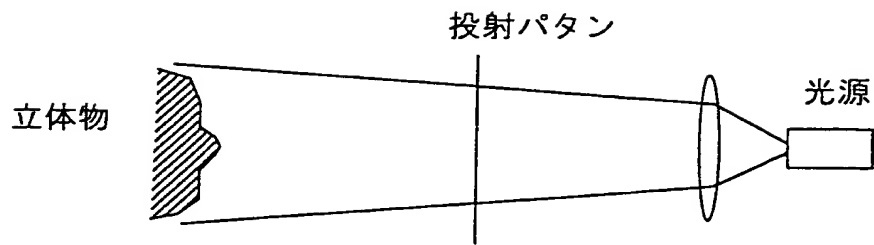
【図 10】



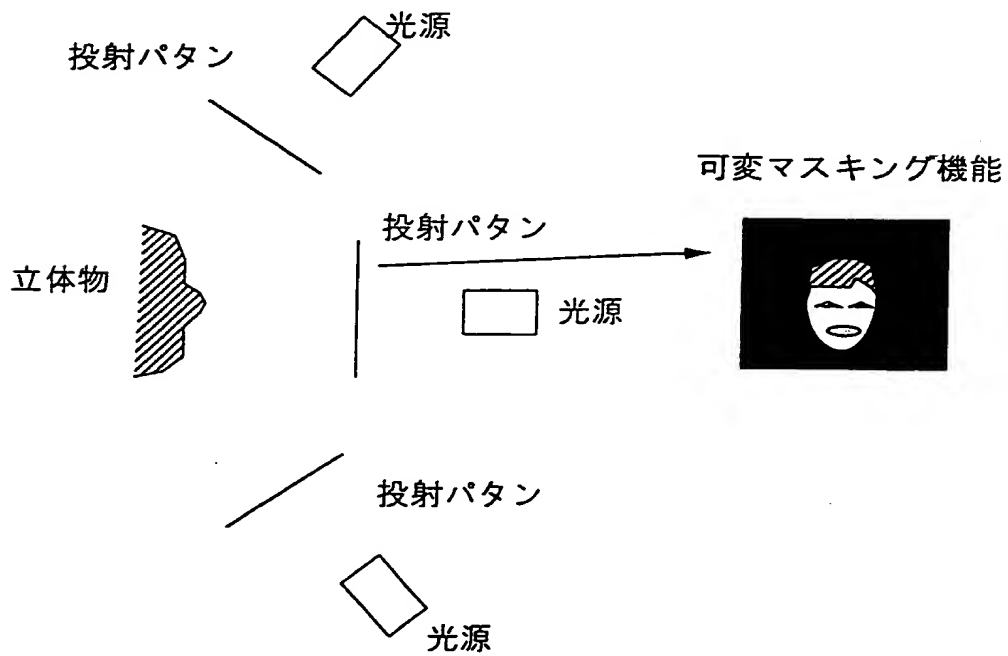
【図 11】



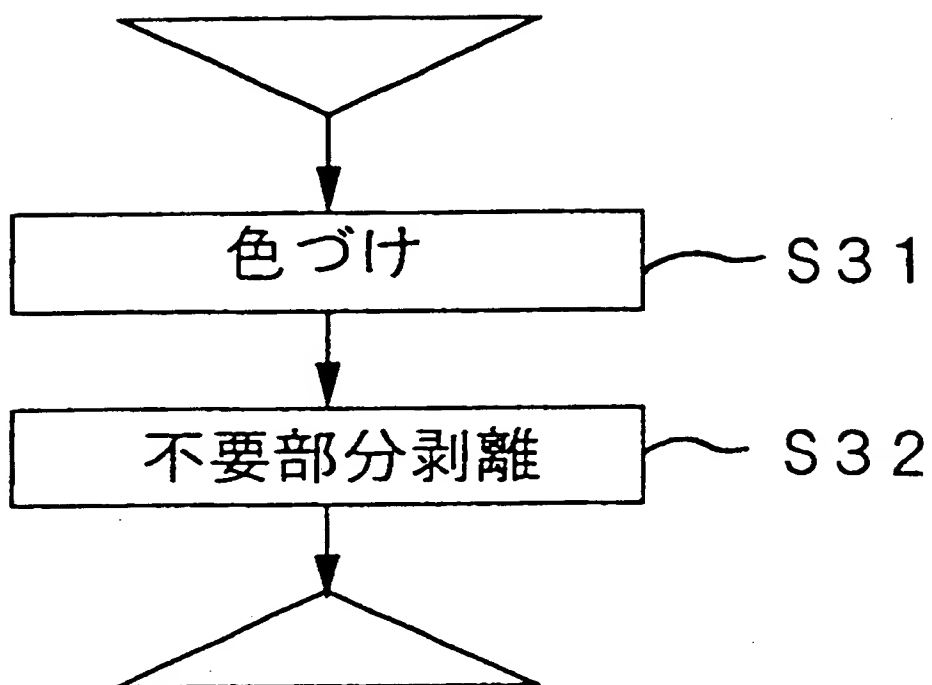
【図 12】



【図 13】



【図 1 4】



【図 1 5】

原材料の色



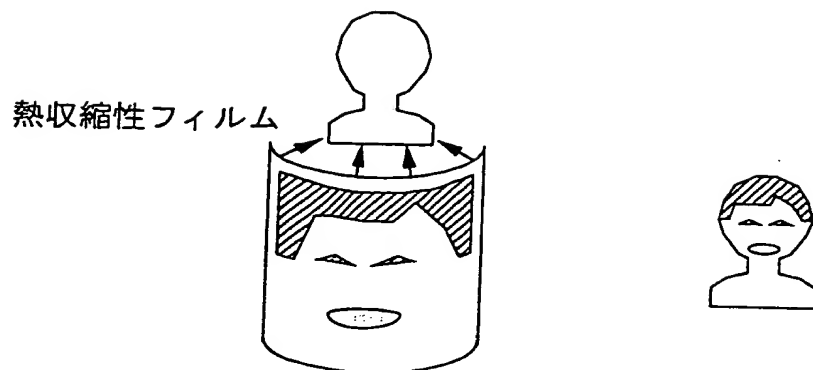
色塗布



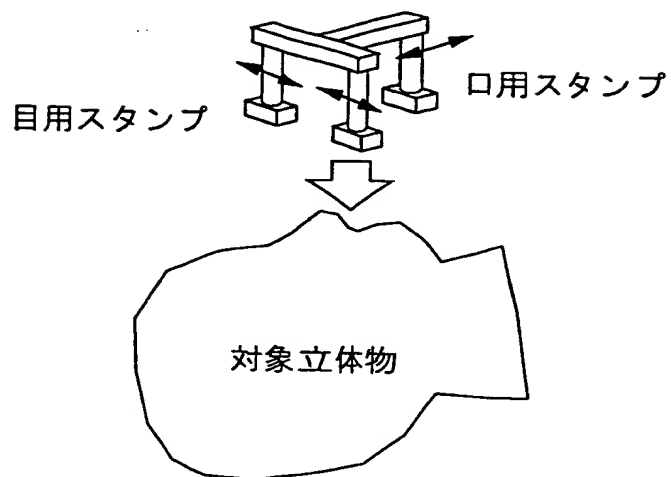
不要部分剥離



【図 1 6】

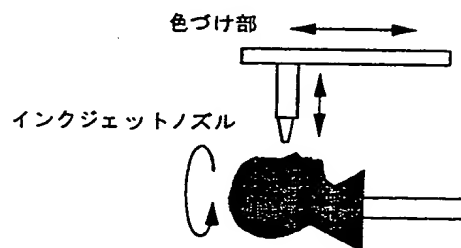


【図 1 7】

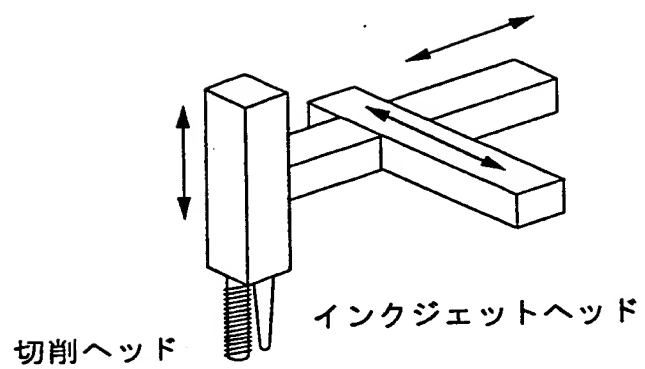


【図 1 8】

3 軸駆動による色づけ



【図 1 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 実立体モデルを効果的に作成する。

【解決手段】 データ入力部 1 0 において、カメラを用い対象物体の複数の画像を得る。この画像に基づき、モデリング部 1 2 において、色彩データを含む三次元形状データを得る。この三次元形状データに基づき成形部 1 4 において実立体モデルを成形する。これは切削や成形型による成形によって行われる。そして、色づけ部 1 6 により、色彩データに基づき、実立体モデルに対し色づけが行われる。

【選択図】 図 1

特平 11-042389

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001889]

1. 変更年月日

1993年10月20日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府守口市京阪本通2丁目5番5号

氏 名

三洋電機株式会社